低淀粉饲粮条件下不同瘤胃降解淀粉水平对体外瘤胃发酵的影响

雒国彬　王利军　刘　岩　张广宁　孙凯晶　王馨影　张永根*

（东北农业大学动物科学技术学院，哈尔滨 150030）

摘　要：本试验旨在研究玉米作为淀粉来源的低淀粉饲粮条件下不同瘤胃降解淀粉（RDS）水平对体外瘤胃发酵的影响。以 3 头安装有永久性瘤胃瘘管的健康荷斯坦奶牛作为瘤胃液供体，各组分别以不同 RDS 水平饲粮作为发酵底物，体外产气法测定培养 48 h 时产气量和瘤胃发酵参数以及 24 h 时瘤胃微生物区系变化。结果表明：1）随着饲粮 RDS 水平的提高，体外培养 48 h 时产气量、潜在产气部分和产气速率呈线性升高（$P<0.05$），快速发酵部分产气量呈线性下降（$P<0.05$），干物质消失率呈线性升高（$P<0.05$）；2）随着饲粮 RDS 水平的提高，体外培养 48 h 时培养液微生物蛋白、乙酸、丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸浓度呈线性升高（$P<0.05$），pH 和氨态氮浓度没有显著变化（$P>0.05$）；3）随着饲粮 RDS 水平提高，体外培养 24 h 时培养液中白色瘤胃球菌和嗜淀粉瘤胃杆菌的相对数量呈线性升高（$P<0.05$），黄色瘤胃球菌、琥珀酸丝状杆菌、溶纤维丁酸弧菌、牛链球菌和溶淀粉琥珀酸单胞菌的相对数量没有显著变化（$P>0.05$）。综合考虑，低淀粉饲粮条件下提高 RDS 水平有利于瘤胃发酵。

关键词：瘤胃降解淀粉；产气量；瘤胃发酵；微生物区系

中图分类号：S816　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

淀粉是奶牛饲粮中重要的能量来源。淀粉是瘤胃中丙酸生成的前体，同时作为葡萄糖的来源直接在小肠被消化吸收。淀粉占谷物中非结构碳水化合物的 70%～80%，通常在瘤胃被迅速降解，几乎全部被消化（很多谷物淀粉的消化率在 90%以上）。谷物在奶牛中被普遍应用于满足奶牛对淀粉和能量的需求。随着发展中国家和生物燃料市场对谷物需求量的日益增加，谷物价格持续上涨。显然，谷物价格的上涨将会影响到奶牛场的盈利，所以低淀粉饲粮引起牛场经营者的关注。目前普遍推荐泌乳奶牛饲粮淀粉水平为 23%～30%（干物质基础）[1]。Dann[2]综述表明，泌乳牛饲粮中副产品饲料（比如豆皮和甜菜颗粒等）替代部分玉米情况下，低淀粉水平（18%～21%）饲粮对奶牛瘤胃发酵和泌乳性能没有负面影响。

收稿日期：2016-12-29

基金项目：国家奶牛产业技术体系项目（CARS-37）

作者简介：雒国彬（1982-），男，山东广饶人，博士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail: guobinluo@126.com

*通信作者：张永根，教授，博士生导师，E-mail: zhangyonggen@sina.com

饲粮淀粉在瘤胃中降解的速率和程度由几个因素共同决定，包括饲粮淀粉来源、饲粮组成、单次采食量、机械作用（谷物加工和奶牛咀嚼）、化学作用（糊化度）和瘤胃微生物对饲粮的适应程度[3]。NRC（2001）[4]给出了泌乳牛全混合日粮中中性洗涤纤维（NDF）最小推荐量和非纤维性碳水化合物（NFC）最大推荐量，而瘤胃降解淀粉（RDS）水平的变化会影响瘤胃 pH[5]、瘤胃 VFA 组成[6-7]、干物质采食量（DMI）[5,8-9]、消化率[8,10]、乳脂率[8]和氮利用率[7,11]，所以，饲粮 RDS 水平会影响饲粮中 NDF 和 NFC 的适宜用量，适宜的 RDS 水平对奶牛生产性能发挥十分必要。在我国，玉米是奶牛饲粮的主要来源，压片玉米和粉碎玉米是奶牛场常用的玉米加工和饲喂形式，压片玉米相比粉碎玉米提高了淀粉的瘤胃降解率（80.3% vs. 67.9%）[12]。本试验通过改变饲粮中粉碎玉米和蒸汽压片玉米的比例设计出 3 种不同 RDS 水平的饲粮，通过体外产气法，研究低淀粉饲粮[淀粉水平为 20%（干物质基础）]条件下不同 RDS 水平对体外瘤胃产气参数、发酵参数和微生物区系的影响，为低淀粉饲粮和淀粉在奶牛生产中的有效应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　饲料样品的制备及成分分析

参照我国《奶牛饲养标准》[13]（NY/T 34—2004）配制 3 种不同 RDS 水平的试验饲粮：低 RDS 水平饲粮（饲粮 RDS 水平为 61.07%，L-RDS 组）、中 RDS 水平饲粮[饲粮 RDS 水平为 67.82%，M-RDS 组]和高 RDS 水平饲粮[饲粮 RDS 水平为 73.74%，H-RDS 组]，试验饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　试验饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis)　　%

项目 Items	组别 Groups		
	L-RDS	M-RDS	H-RDS
原料 Ingredients			
玉米青贮 Corn silage	18.35	18.35	18.35
苜蓿 Alfalfa hay	9.20	9.20	9.20
羊草 Chinese wild rye	7.40	7.40	7.40
全棉籽 Whole cottonseed	8.28	8.28	8.28
湿啤酒糟 Wet brewers grains	5.18	5.18	5.18
甜菜颗粒 Beet pulp	4.07	4.07	4.07

压片玉米 Steam-flaked corn	0.00	10.25	20.50
粉碎玉米 Finely ground corn	20.50	10.25	0.00
豆粕 Soybean meal	9.50	9.50	9.50
干酒糟及其可溶物 DDGS	8.23	8.23	8.23
麸皮 Wheat bran	4.39	4.39	4.39
豆皮 Soybean hull	2.10	2.10	2.10
预混料 Premix[1)]	2.26	2.26	2.26
碳酸氢钠 $NaHCO_3$	0.54	0.54	0.54
合计 Total	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]			
干物质 DM	56.7	56.7	56.6
有机物 OM	92.4	92.3	92.4
粗蛋白质 CP	17.7	17.5	17.4
粗脂肪 EE	4.0	3.5	4.1
中性洗涤纤维 NDF	34.5	34.5	34.1
酸性洗涤纤维 ADF	19.1	19.3	18.9
粗灰分 Ash	7.6	7.7	7.6
淀粉 Starch	21.4	22.5	22.6
泌乳净能 NE_L/(MJ/kg DM)	6.95	6.99	7.03

[1)]每千克预混料含有 One kg of Premix contained the following：VA 400 000 IU，VD 40 000 IU，VE 600 IU，Ca 160 g，P 33 g，Na 118 g，Mg 29 g，Zn 2 600 mg，Mn 2 400 mg，Cu 550 mg，Se 12 mg，I 25 mg。

[2)]泌乳净能根据《奶牛饲养标准》[13]计算得出，其他营养水平为实测值。NE_L was calculated based on *Feeding Standards of Dairy Cattle*, while the other nutrient levels were measured values.

饲粮 RDS 水平采用半体内尼龙袋法[14]测定。试验选用 3 头带有永久性瘤胃瘘管的健康中国荷斯坦奶牛[体重：（678±27） kg；产奶量：(20.6±2.5) kg；泌乳天数：(276±19) d]，试验牛饲粮由 28.9%的玉米青贮、24.2%的羊草和 46.9%的精料（均为干物质基础）组成。每天饲喂 2 次，挤奶二次，自由采食与饮水，单栏栓系饲养。饲粮粉碎通过 3 mm 孔径筛，准确称取 5 g 待测样品，装入已知重量标号的尼龙袋（10 cm×20 cm；孔径为 50 μm；Ankom 公司提供），样品分别在瘤胃中培养 72、48、24、12、8、4、2 和 0 h。尼龙袋瘤胃培养和培

养后操作步骤参照 Yu 等[21]，样品 65 ℃烘 48 h，回潮至恒重，粉碎过 1 mm 孔径筛用于饲粮淀粉瘤胃降解参数的测定。饲粮淀粉瘤胃降解参数见表 2。

表 2　饲粮淀粉瘤胃降解参数

Table 2　Starch degradation parameters of diets

项目 Items	组别 Groups		
	L-RDS	M-RDS	H-RDS
瘤胃培养可溶部分 S/%	24.7	20.0	15.3
瘤胃培养可降解部分 D/%	73.42	75.20	77.67
瘤胃培养不可降解部分 U/%	1.89	4.80	7.03
瘤胃培养可降解部分降解速率 Kd/(%/h)	5.89	10.50	18.25
瘤胃不可降解淀粉 RUS/%	26.2	32.18	38.93
瘤胃降解淀粉 RDS/%	61.07	67.82	73.74

假设瘤胃外流速率为 6%/h 计算 calculated assuming a rumen outflow rate of 6%/h。

1.2　瘤胃液的采集与处理

2016年6月在黑龙江省双城市雀巢奶牛养殖培训中心奶牛场选用 3 头体重约600 kg的安装有永久性瘤胃瘘管的荷斯坦奶牛作为瘤胃液供体牛，于晨饲前2 h通过瘤胃瘘管采集瘤胃液，混合后装于预加热保温瓶中迅速带回实验室，将采集的瘤胃液充分混合后经4层纱布过滤（过滤同时通入CO_2）备用，整个操作在39 ℃温水浴中进行。

1.3　体外发酵

体外发酵装置采用德国 Endress+Hauser 公司生产的产气全自动记录装置（型号：Cerabar T PMP131，Memograph M RSG40）和软件系统（奥特奇公司提供）。将试验所用样品粉碎并全部通过孔径为 1 mm 的样品筛。准确称取 0.5 g 样品放入 150 mL 厌氧发酵瓶中，每个处理 6 个重复，并做 3 个空白。接种时边搅拌边加入已在 39 ℃预热的缓冲液 50 mL 和新鲜瘤胃液 25 mL，所用液体培养基采用 Menke 等[15]方法配制，向瓶中持续通入 CO_2 5 s 后，将每个产气装置的传感器与数据记录仪相连接，发酵瓶于 39.2 ℃下连续培养 24 和 48 h。

1.4　样品收集和预处理

体外培养24和48 h后各样品组分别取出3个发酵瓶，24 h时取10 mL培养液快速转移至-80 ℃冰箱内保存，用于微生物总DNA的提取。48 h时结束发酵，立即测定发酵液pH，从发酵瓶中采集50 mL发酵液分装于离心管中，按与发酵液1：5的比例添加25%偏磷酸溶液，混

匀后于-20 ℃冷冻保存，用于微生物蛋白（MCP）、氨态氮（NH_3-N）和挥发性脂肪酸（VFA）浓度的测定。尼龙袋（孔径：40μm 规格：45 mm×55 mm）过滤48 h发酵液，将尼龙袋过滤的滤渣连同尼龙袋在水龙头下冲洗至水澄清，在65 ℃烘箱内烘至恒重，计算样品的体外干物质消失率（DMD）。

1.5 测定指标及方法

干物质、粗灰分、粗蛋白质、粗脂肪和无机物含量的测定参照 AOAC（1990）[16]中方法。pH 采用 Sartorius Basic pH Meter PB-20 型酸度计（赛多利斯科学仪器北京有限公司）测定。淀粉水平测定采用淀粉葡萄糖苷酶/α-淀粉酶方法，试剂盒购自爱尔兰 Megazyme 公司。酸性洗涤纤维（ADF）和 NDF 含量的测定参照 Van Soest 等[17]方法，采用 Ankom 220 纤维分析仪（美国 ANKOM 公司）。

NH_3-N 浓度采用 Broderick 等[18]所述的靛酚比色法测定，仪器采用 UV-2000 型分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）。

MCP 浓度采用 Makkar 等[19]所述的嘌呤法测定，具体方法为：利用酵母 RNA 制作标准曲线，取 8 mL 发酵液在 13 200 r/min 下离心 20 min，进行前处理后利用 UV-2000 型分光光度计在 260 nm 波长下进行比色，根据吸光度值和标准曲线计算样品 RNA 测定值。MCP 浓度计算公式为：

微生物蛋白氮浓度（mg/mL）=RNA 测定值（mg/mL）×RNA 含氮量（17.83%）/细菌氮中 RNA 含氮量（10%）×稀释倍数；

MCP 浓度（mg/mL）=微生物蛋白氮浓度（mg/mL）×6.25。

VFA 浓度采用日本岛津 GC-200 气相色谱仪测定[20]，测定时气谱条件为：气化室参数为载气氮气（N_2），分流比 40：1，进样量 0.4 μL，温度 220 ℃；色谱柱参数为 HP-INNOwax 毛细管色谱柱恒流模式，流量 2.0 mL/min，平均线速度 38 cm/s；柱温箱参数为程序升温 120 ℃（3 min）→10 ℃/min→180 ℃（1 min）；检测器参数为氢气（H_2）流量 40 mL/min，空气流量 450 mL/min，柱流量+尾吹气流量 45 mL/min，火焰离子检测器（FID）温度 250 ℃。

微生物区系测定：采用珠磨-十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法提取瘤胃微生物总DNA[21]。提取后，用紫外可见分光光度计测定所提取总DNA的浓度和纯度，确保260 nm与280 nm处光密度（OD）的比值在1.6~1.8之间。采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）技术检测微生物相对数量，所用仪器为ABI7500型PCR仪，RT-qPCR的反应条件参照SYBR Premix Ex Taq^{TM}试剂建立20 μL反应体系。从瘤胃微生物总DNA中扩增细菌16S rDNA。PCR反应体系：10×缓冲液2 μL，10 mmol/L的dNTP 0.4 μL，10 μmol/L的上、下游引物各0.8 μL，25 mmol/L

的氯化镁（$MgCl_2$）1.6 μL，模板（瘤胃总DNA）0.4 μL，TaqDNA聚合酶2 μL，双蒸水（ddH_2O）为13.6 μL，总体积为20 μL。PCR反应参数：95 ℃变性7 min，95 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 3 min，35个循环；72 ℃延伸7 min。引物序列及参考文献见表3，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 3　荧光定量 PCR 引物

Table 3　Primers used for RT-PCR

项目 Items	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	参考文献 References
总菌 Total bacterial	GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG	CTGCTGCCTCCCGTAG	Khafipour 等[22]
黄色瘤胃球菌 *R. flavefaciens*	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	Denman 等[23]
白色瘤胃球菌 *R. albus*	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	Wang 等[24]
琥珀酸丝状杆菌 *F. succinogenes*	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	CGCCTGCCCCTGAACTATC	Denman 等[23]
溶纤维丁酸弧菌 *B. fibrisolvens*	ACCGCATAAGCGCACGGA	CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT	Stevenson 等[25]
牛链球菌 *S. bovis*	TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG	ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	Stevenson 等[25]
嗜淀粉瘤胃杆菌 *R. amylophilus*	CTGGGGAGCTGCCTGAAT	CATCTGAATGCGACTGGTTG	Stevenson 等[25]
溶淀粉琥珀酸单胞菌 *S. amylolytica*	CGTTGGGCGGTCATTTGAAAC	CCTGAGCGTCAGTTACTATCCAGA	Khafipour 等[26]

1.6　计算公式

根据瘤胃动力学数学指数模型计算饲粮 RDS 水平[27]，运用 SAS 9.2 非线性回归最小二乘法对数据进行处理。

采用动态发酵模型 $GP=a+b(1-e^{-ct})$[28]，根据非线性最小二乘法原理，求出 a、b 和 c 值，其中 a 为饲粮快速发酵部分的产气量（mL）；b 为慢速发酵部分的产气量（mL）；c 为 b 的产气速率（%/h）；$a+b$ 为潜在产气量（mL）；GP 为 t 时的产气量（mL）。

样本干物质消失率（%）=[（样本质量-残渣质量）/样本质量]×100。

根据以下公式将瘤胃微生物相对数量表示为相对于瘤胃总细菌16S rDNA的百分比：

目标菌相对数量（%）=$2^{-(Ct_{目标菌}-Ct_{总细菌})}$×100。

式中：$Ct_{目标菌}$为以目标菌引物所测的Ct值；$Ct_{总细菌}$为以总细菌为引物所得的Ct值。

1.7　统计分析

试验数据采用 Excel 2010 软件处理后，采用 SAS 9.1 软件中 MIXED 模型进行统计分析，对饲粮 RDS 水平的线性和二次曲线效应进行了正交多项式对比分析，P<0.05 表示差异显著，0.05≤P<0.10 表示具有差异显著的趋势。

2　结果与分析

2.1　不同RDS水平饲粮对体外培养48 h产气量、产气参数及干物质消失率的影响

由表 4 可知，随着饲粮 RDS 水平的提高，体外培养 48 h 的产气量、潜在产气量、产气速率和干物质消失率呈线性升高（P<0.05），快速发酵部分产气量则呈线性降低（P<0.05）。L-RDS 组和 M-RDS 组间的所有指标均不存在显著差异（P>0.05）。除了快速发酵部分产气量显著低于 L-RDS 组（P<0.05）外，H-RDS 组的其他指标均显著高于 L-RDS 组（P<0.05）。H-RDS 组的产气量和潜在产气量显著高于 M-RDS 组（P<0.05），两者间的其他指标无显著差异（P>0.05）。

表 4　不同 RDS 水平饲粮对体外培养 48 h 产气量、产气参数及干物质消失率的影响

Table 4　Effects of different RDS level diets on GP, gas parameters and DMD after 48 h *in vitro* incubation

项目 Items	组别 Groups			SEM	*P* 值 *P*-value		
	L-RDS	M-RDS	H-RDS		组间 Group	线性 Linear	二次 Quadratic
产气量 GP/mL	131.85[b]	133.68[b]	141.93[a]	1.30	<0.05	<0.05	0.10
产气参数 Gas parameters							
快速发酵部分产气量 a/mL	1.09[a]	0.67[ab]	0.50[b]	0.10	<0.05	<0.05	0.35
潜在产气量 a+b/mL	127.72[b]	129.62[b]	138.75[a]	1.22	<0.05	<0.05	0.09
产气速率 c/(%/h)	0.089[b]	0.092[ab]	0.097[a]	0.001	0.03	<0.05	0.32
干物质消失率 DMD/%	57.86[b]	58.38[ab]	60.29[a]	0.7	<0.05	<0.05	0.22

同行数据肩标无字母或相同小写字母表示差异不显著（P>0.05），不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。下表同。

In the same row, values with no letter or the same small letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 不同RDS水平饲粮对体外培养48 h培养液pH及MCP、NH_3-N、VFA浓度的影响

由表 5 可知，饲粮 RDS 水平对培养液 pH、NH_3-N 浓度和乙酸/丙酸值没有显著影响（P>0.05）。随着饲粮 RDS 水平的提高，培养液 MCP、乙酸、丙酸、丁酸和总挥发性脂肪酸（TVFA）浓度呈线性升高（P<0.05），其中 M-RDS 组除 MCP 浓度显著低于 H-RDS 组（P<0.05）外，其他指标 2 组间无显著差异（P>0.05），而 H-RDS 组上述指标都显著高于 L-RDS 组（P<0.05）。L-RDS 组培养液 MCP、丙酸和丁酸浓度与 M-RDS 组无显著差异（P>0.05），但乙酸和 TVFA 浓度显著低于 M-RDS 组（P<0.05）。

表 5　不同 RDS 水平饲粮对体外培养 48 h 培养液 pH 及 MCP、NH_3-N、VFA 浓度的影响

Table 5　Effects of different RDS level diets on fermentation fluid pH and MCP, NH_3-N, VFA concentrations after 48 h *in vitro* incubation

项目 Items	组别 Groups				P 值 P-value		
	L-RDS	M-RDS	H-RDS	SEM	组间 Group	线性 Linear	二次 Quadratic
pH	6.58	6.49	6.54	0.04	0.32	0.49	0.19
微生物蛋白 MCP/(mg/mL)	2.49^{b}	2.50^{b}	2.62^{a}	0.03	<0.05	<0.05	0.09
氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)	18.61	18.07	18.79	0.57	0.67	0.82	0.41
乙酸 Acetate/(mmol/L)	38.08^{b}	53.58^{a}	59.58^{a}	3.78	<0.05	<0.05	0.33
丙酸 Propionate/(mmol/L)	15.90^{b}	23.12^{ab}	24.02^{a}	1.89	<0.05	<0.05	0.21
丁酸 Butyrate/(mmol/L)	6.54^{b}	10.02^{ab}	12.78^{a}	0.95	<0.05	<0.05	0.77
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	67.85^{b}	98.45^{a}	101.95^{a}	7.73	<0.05	<0.05	0.19
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	2.40	2.33	2.48	0.06	0.22	0.35	0.13

2.3 不同 RDS 水平饲粮对体外培养 24 h 培养液微生物区系的影响

由表 6 可知，随着饲粮 RDS 水平的提高，培养液中白色瘤胃球菌（*R. albus*）和嗜淀粉瘤胃杆菌（*R. amylophilus*）的相对数量呈线性升高（P<0.05），其中 H-RDS 组 *R. albus* 和 *R. amylophilus* 的相对数量显著高于 L-RDS 组和 M-RDS 组（P<0.05），L-RDS 组和 M-RDS 组间差异不显著（P>0.05）。饲粮 RDS 水平对黄色瘤胃球菌（*R. flavefaciens*）、琥珀酸丝状杆菌（*F.*

succinogenes）、溶纤维丁酸弧菌（*B. fibrisolvens*）、牛链球菌（*S. bovis*）和溶淀粉琥珀酸单胞菌（*S. amylolytica*）的相对数量的影响不显著（*P*>0.05）。

表 6　不同 RDS 水平饲粮对体外培养 24 h 培养液微生物区系的影响

Table 6　Effects of different RDS level diets on fermentation fluid microflora after 24 h *in vitro* incubation

项目 Item	L-RDS	M-RDS	H-RDS	SEM	*P* 值 *P*-value		
					组间 Group	线性 Linear	二次 Quadratic
黄色瘤胃球菌 *R. flavefaciens*/×10^{-2}%	4.60	3.44	4.86	0.40	0.16	0.75	0.08
白色瘤胃球菌 *R. albus*/×10^{-2}%	3.06^{b}	3.52^{b}	6.18^{a}	0.35	＜0.05	＜0.05	0.07
琥珀酸丝状杆菌 *F. succinogenes*/×10^{-2}%	9.20	8.42	8.81	0.38	0.45	0.50	0.31
溶纤维丁酸弧菌 *B. fibrisolvens*/×10^{-2}%	2.73	1.77	3.1	0.58	0.37	0.72	0.20
牛链球菌 *S. bovis*/×10^{-1}%	6.63	5.85	6.13	0.26	0.26	0.26	0.21
嗜淀粉瘤胃杆菌 *R. amylophilus*/×10^{-1}%	5.45^{b}	5.91^{b}	7.57^{a}	0.19	＜0.05	＜0.05	0.06
溶淀粉琥珀酸单胞菌 *S. amylolytica*/%	2.11	1.77	2.08	0.32	0.74	0.93	0.48

3　讨　论

3.1　不同RDS水平饲粮对体外培养48 h瘤胃产气量、产气参数及干物质消失率的影响

体外培养产气量是评定饲料可发酵程度的重要指标，即饲料的可发酵性越强，瘤胃中微生物的活性越高，产气量越大，反之则越少。本试验体外培养 48 h 的产气量随饲粮 RDS 水平的提高而升高，这与 Palizdar 等[29]和张婷等[30]报道的结果一致，因为饲粮中压片玉米替代粉碎玉米使淀粉更容易被微生物和酶利用[31]，淀粉降解产生大量能量促进微生物的生长繁殖，提高了发酵产气量。本试验结果表明高 RDS 水平饲粮提高了潜在产气量和产气速率，这与 Palizdar 等[29]的研究结果一致，淀粉的快速降解促进微生物对营养物质的利用，促进了

发酵，干物质消失率提高提供部分解释；而快速发酵部分产气量随饲粮 RDS 水平的提高呈下降趋势，可能归因于饲粮淀粉瘤胃培养可溶部分的降低。

3.2 不同RDS水平饲粮对体外培养48 h培养液pH及MCP、NH_3-N、VFA浓度的影响

pH 作为瘤胃内环境变化的重要指标，受饲粮的组成、唾液分泌量和有机酸的累积等多种因素影响。普遍观点认为提高可发酵碳水化合物水平会增加短链脂肪酸产量和瘤胃酸中毒的风险，导致瘤胃 pH 降低[32]。本试验结果表明饲粮 RDS 水平对体外培养 48 h 培养液 pH 没有显著影响，这与张婷等[30]的体外试验的结果一致。其原因可能是随着体外培养时间的延长，各组淀粉降解率趋于相似，而 pH 与淀粉降解的相关性很高[33]，所以培养 48 h 时各处组间培养液 pH 差异不显著。瘤胃中 NH_3-N 浓度是反映瘤胃氮代谢的重要指标，其浓度大小可反映蛋白质的降解程度和微生物利用氨氮的能力。Murphy 等[34]报道微生物发酵的最佳 NH_3-N 浓度为 6.3～27.5 mg/dL，本试验各组培养液 NH_3-N 浓度均在适合微生物发酵的范围内。本试验结果还表明，提高饲粮 RDS 水平对培养液 NH_3-N 浓度的影响不显著。张婷等[30]研究得出体外发酵压片玉米替代粉碎玉米饲粮对发酵液 NH_3-N 浓度的影响不显著，本试验结果与此一致。而与 Zhong 等[8]和 Aldrich 等[35]体内试验报道的通过蒸汽压片玉米提高 RDS 水平降低了瘤胃 NH_3-N 浓度的结果不一致。结果不一致原因可能是：一方面，谷物加工后增加 4～8 h 时间段体外培养淀粉降解率[36]，此时能氮释放同步性能促使微生物生长繁殖和 MCP 的合成，提高了微生物对 NH_3-N 的利用，而培养时间延长使各组淀粉降解率趋于相似，促使微生物对 NH_3-N 利用能力趋于一致；另一方面，蒸汽压片技术破坏玉米蛋白质空间结构，提高了蛋白质瘤胃降解率[37]，导致蛋白质的分解和 NH_3-N 的生成。

本试验结果表明提高饲粮 RDS 水平提高了 MCP 的合成，与之前 Plascencia 等[6]和 Theurer 等[38]的报道一致，MCP 合成取决于瘤胃可利用能量和可利用氮的数量以及发酵速度的同步性。高饲粮 RDS 水平下 *R. albus* 和 *R. amylophilus* 的相对数量较高，表明高饲粮 RDS 水平促进了有关微生物的生长，这可能因为高 RDS 水平有更高的瘤胃降解有机物水平[39]，为瘤胃微生物生长繁殖提供能量，同时，压片玉米蛋白瘤胃降解率的提高可能是提高 MCP 浓度的另一原因。也有相关报道[11]表明提高饲粮 RDS 水平对 MCP 浓度的影响不显著，结果不一致可能是由于瘤胃内快速降解淀粉降低了瘤胃内纤维物质消化率，对瘤胃发酵产生负面效应，减少了瘤胃降解有机物水平，影响了 MCP 的合成。VFA 是反刍动物能量代谢的主要能量来源，而乙酸、丙酸和丁酸的量占主要能源物质的 80%。本试验发现，提高饲粮 RDS 水平可不同程度地提高乙酸、丙酸和丁酸的浓度。张婷等[30]体外试验表明饲粮中压片玉米代替普通玉米有升高乙酸浓度的趋势，使丙酸和丁酸浓度显著升高，与本试验结果类似。而

相关体内试验表明提高饲粮 RDS 水平降低了乙酸浓度[7]，提高了丙酸浓度[10]，对丁酸浓度无显著影响[7,10]。试验饲粮中压片玉米中淀粉相比粉碎玉米中淀粉更易被微生物和酶利用，淀粉的快速降解导致丙酸浓度升高，而乙酸和丁酸浓度升高可能是由于高 RDS 水平有更高的瘤胃降解有机物水平[39]，可为微生物生长提供能量，促进了微生物对营养物质的分解，提高了乙酸和丁酸的产量。本试验结果表明饲粮 RDS 水平对乙酸/丙酸值没有显著影响，结果与张婷等[30]所得结果一致，与 Shen 等[7]所得结果不一致，可能是因为不同饲粮情况下 RDS 对瘤胃发酵的影响不同，导致了乙酸和丙酸浓度的差异。

3.3 不同 RDS 水平饲粮对体外培养 24 h 培养液微生物区系的影响

瘤胃中的纤维分解菌主要有 *R. flavefaciens*、*R. albus* 和 *F. succinogenes*，本试验结果表明体外培养 24 h 培养液 *R. albus* 相对数量随饲粮 RDS 水平的提高而升高，而各组 *R. flavefaciens* 和 *F. succinogenes* 相对数量差异不显著。李飞[40]研究表明，饲粮中不同比例的小麦替代玉米饲喂奶山羊，瘤胃液中 *R. flavefaciens* 相对数量呈线性下降，*F. succinogenes* 相对数量呈二次曲线变化趋势，对 *R. albus* 相对数量的影响不显著。胡红莲[41]研究表明，随着饲粮中玉米比例的提高，奶山羊瘤胃液中 3 种纤维分解菌（*R. flavefaciens*、*F. succinogenes* 和 *R. albus*）的相对数量逐渐下降。上述研究结果不一致可能是由于瘤胃液 pH 不同造成的，因为提高可发酵碳水化合物水平会增加短链脂肪酸产量和瘤胃酸中毒的风险，导致瘤胃 pH 降低[32,42]，纤维分解菌普遍对瘤胃 pH 敏感，当 pH 低于 6.0 时，瘤胃球菌和 *F. succinogenes* 等主要的纤维降解菌的生长将受到抑制[43]。而本试验中各组培养液 pH 处于正常范围，同时 NH_3-N 浓度在适合微生物发酵的范围内，*R. albus* 相对数量的增长可能是因为高 RDS 水平提供了更多的瘤胃降解有机物[39]，从而为瘤胃微生物的生长繁殖提供了能量。*B. fibrisolvens* 的不同菌株表现差异较大，有的菌株具有很强的淀粉降解活性，有的菌株具有很强的纤维降解活性，本试验中各组培养液 *B. fibrisolvens* 相对数量差异不显著，此结果与申军士[44]所得结果一致。*S. bovis*、*R. amylophilus* 和 *S. amylolytica* 是主要的淀粉降解菌，申军士[44]研究表明，饲粮中压片玉米替代粉碎玉米饲喂奶牛，瘤胃液 *S. bovis* 相对数量上升，*R. amylophilus* 相对数量下降，*S. amylolytica* 相对数量没有显著变化。李飞[40]研究表明，饲粮中压片玉米替代粉碎玉米饲喂奶牛，瘤胃液 *S. amylolytica* 相对数量升高，对 *S. bovis* 和 *R. amylophilus* 相对数量无显著影响。上述研究结果不完全一致，可能与饲粮 RDS 水平和淀粉降解速率的差异有关，其原因有待进一步研究。

4 结　论

低淀粉饲粮条件下提高饲粮 RDS 水平提高了体外培养 48 h 的产气量、潜在产气部分和

产气速率，提高了体外培养 48 h 培养液 MCP、乙酸、丙酸、丁酸和 TVFA 浓度，而对 pH 和氨态氮浓度无显著影响，提高了体外培养 24 h 培养液白色瘤胃球菌和嗜淀粉瘤胃杆菌的相对数量。由此得出，低淀粉饲粮条件下提高饲粮 RDS 水平有利于瘤胃发酵。

参考文献：

[1] GRANT R,EASTRIDGE M L.Optimizing starch concentrations in dairy rations[C]//Proceedings of the tri-state dairy nutrition conference.Indiana:Fort Wayne,2005:73–79.

[2] DANN H M.Feeding low-starch diets to lactating dairy cows[C]//Proceedings of the 21st Florida ruminant nutrition symposium.[S.l.]:[s.n.]2010:80–91.

[3] HUNTINGTON G B.Starch utilization by ruminants:from basics to the bunk[J].Journal of Animal Science,1997,75(3):852–867.

[4] NRC.Nutrient requirements of dairy cattle[S].7th ed.Washington,D.C.:National Academy Press,2001.

[5] YANG W Z,BEAUCHEMIN K A,RODE L M.Effects of barley grain processing on extent of digestion and milk production of lactating cows[J].Journal of Dairy Science,2000,83(3):554–568.

[6] PLASCENCIA A,ZINN R.Influence of flake density on the feeding value of steam-processed corn in diets for lactating cows[J].Journal of Animal Science,1996,74(2):310–316.

[7] SHEN J S,SONG L J,SUN H Z,et al.Effects of corn and soybean meal types on rumen fermentation,nitrogen metabolism and productivity in dairy cows[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2015,28(3):351–359.

[8] ZHONG R Z,LI J G,GAO Y X,et al.Effects of substitution of different levels of steam-flaked corn for finely ground corn on lactation and digestion in early lactation dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2008,91(10):3931–3937.

[9] OBA M,ALLEN M S.Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations[J].Journal of Dairy Science,2003,86(1):174–183.

[10] MIYAJI M,MATSUYAMA H,HOSODA K,et al.Milk production,nutrient digestibility and nitrogen balance in lactating cows fed total mixed ration silages containing steam-flaked brown rice as substitute for steam-flaked corn,and wet food by-products[J].Animal Science

Journal,2013,84(6):483–488.
[11] MIYAJI M,MATSUYAMA H,HOSODA K.Effect of substituting brown rice for corn on lactation and digestion in dairy cows fed diets with a high proportion of grain[J].Journal of Dairy Science,2014,97(2):952–960.
[12] ZEBELI Q,MANSMANN D,STEINGASS H,et al.Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch:A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle[J].Livestock Science,2010,127(1):1–10.
[13] 中华人民共和国农业部.NY/T 34–2004 奶牛饲养标准[S].北京:中国农业出版社,2004.
[14] MENKE K H,STEINGASS H.Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid[J].Animal Research and Development,1988,28(1):7–55.
[15] AOAC.Official methods of analysis[S].Arlington,VA:AOAC,1990.
[16] VAN SOEST P J,ROBERTSON J B,LEWIS B A.Methods for dietary fiber,neutral detergent fiber,and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3583–3597.
[17] BRODERICK G A,KANG J H.Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media 1[J].Journal of Dairy Science,1980,63(1):64–75.
[18] MAKKAR H P S,BECKER K.Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods[J].British Journal of Nutrition,1999,81(2):107–112.
[19] 王加启.反刍动物营养学研究方法[M].北京:现代教育出版社,2011:139–140.
[20] YU Z,MORRISON M.Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples[J].Biotechniques,2004,36(5):808–812.
[21] YU P,CHRISTENSEN D,MCKINNON J.*In situ* rumen degradation kinetics of timothy and alfalfa as affected by cultivar and stage of maturity[J].Canadian Journal of Animal Science,2004,84(2):255–263.
[22] KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(3):1060–1070.

[23] DENMAN S E,MCSWEENEY C S.Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen[J].Fems Microbiology Ecology,2006,58(3):572–582.

[24] WANG R F,CAO W W,CERNIGLIA C E.PCR detection of *Ruminococcus* spp.in human and animal faecal samples[J].Molecular and Cellular Probes,1997,11(4):259–265.

[25] STEVENSON D M,WEIMER P J.Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2009,75(5):165–174.

[26] KHAFIPOUR E,LI S C,PLAIZIER J C,et al.Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis[J].Applied and Environmental Microbiology,2009,75(22):7115–7124.

[27] ØRSKOV E R.The effect of processing on digestion and utilization of cereals by ruminants[J].Proceedings of the nutrition Society,1976,35(2):245–252.

[28] ØRSKOV E R,MCDONALD I.The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J].Journal of Agricultural Science,1979,92(2):499–503.

[29] PALIZDAR M,MOHAMMADIAN-TABRIZI H,POURELMI M,et al.Effect of using steam flaked and extruded corn grain in total mixed ration on *in vitro* rumen fermentation kinetics and gas production[J].Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences,2014,4(2):101–106.

[30] 张婷,张彬,张佩华,等.不同能量水平及玉米加工饲粮对瘤胃体外发酵参数的影响[J].草业学报,2015,24(12):102–111.

[31] CHEN T,GAO Y X,CAO Y F,et al.Effects of steam-flaked corn on the production performance and excretion of nitrogen and phosphorus in dairy cows[J].Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences,2009,40(12):1769–1775.

[32] CHIBISA G E,GORKA P,PENNER G B,et al.Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on ruminal function,short-chain fatty acid absorption,nitrogen utilization,and production performance of dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2015,98(4):2627–2640.

[33] YANG W Z,BEAUCHEMIN K A,RODE L M.Effects of grain processing,forage to

concentrate ratio,and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2001,84(10):2203–2216.

[34] MURPHY J J,KENNELLY J J.Effect of protein concentration and protein source on the degradability of dry matter and protein in situ[J].Journal of Dairy Science,1987,70(9):1841–1849.

[35] ALDRICH J M,MULLER L D,VARGA G A,et al.Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation,nutrient flow,and performance of dairy cows[J].Journal of Dairy Science,1993,76(4):1091–1105.

[36] RAMIREZ R G,KIESLING H E,GALYEAN M L,et al.Influence of steam-flaked,steamed-whole or whole shelled corn on performance and digestion in beef steers[J].Journal of Animal science,1985,61(1):1–8.

[37] 乔富强.玉米、小麦、稻谷蒸汽压片处理对其化学成分、瘤胃发酵和能量价值的影响[D].博士学位论文.北京:中国农业大学,2014:39–45.

[38] THEURER C B,HUBER J T,DELGADO-ELORDUY A,et al.Invited review:Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,1999,82(9):1950–1959.

[39] KRAUSE K M,COMBS D K,BEAUCHEMIN K A.Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows.I.Milk production and diet digestibility[J].Journal of Dairy Science,2002,85(8):1936–1946.

[40] 李飞.奶山羊亚急性瘤胃酸中毒模型构建与奶牛日粮 CBI 的优化[D].博士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2014:30–31.

[41] 胡红莲.奶山羊亚急性瘤胃酸中毒营养生理机制的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2008:81–90.

[42] KRAUSE K M,COMBS D K.Effects of forage particle size,forage source,and grain fermentability on performance and ruminal pH in midlactation cows[J].Journal of Dairy Science,2003,86(4):1382–1397.

[43] RUSSELL J B,WILSON D B.Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?[J].Journal of Dairy Science,1996,79(8):1503–1509.

[44] 申军士.日粮能氮释放同步性对奶牛瘤胃代谢、生产效率与性能的影响研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2013:61–77.

Effects of Ruminally Degradable Starch Level in Low Starch Diets on *in Vitro* Ruminal Fermentation

LUO Guobin WANG Lijun LIU Yan ZHANG Guangning SUN Kaijing WANG Xinying ZHANG Yonggen*

(*School of Animal Science and Technology*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract: This trial was performed to examine the effects of ruminally degradable starch levels in diet with low corn-based starch on *in vitro* ruminal fermentation. Three Holstein cows fitted with permanent rumen fistulas were used as the donor of rumen fluid. Diets with different ruminally degradable starch levels were used as substrates, and the changes of gas production and ruminal fermentation parameters during 48 h incubation were determined using *in vitro* gas production method, and the ruminal microflora change during 24 h incubation were also determined. The results showed as follows: 1) with the ruminally degradable starch level increasing, gas production (GP), potential gas production (a+b) and gas production rate constant for “gas production from the slowly soluble fraction (b)” (c) were linearly increased (P<0.05), the gas production from the immediately soluble fraction (a) was linearly decreased (P<0.05), and the dry matter digestibility was linearly increased after 48 h *in vitro* incubation (P<0.05). 2) With the ruminally degradable starch level increasing, fermentation fluid microprotein (MCP), acetate, propionate, butyrate and total volatile fatty acids (TVFA) concentrations were linearly increased after 48 h *in vitro* incubation (P<0.05), but the pH and ammonianitrogen concentration were not significantly changed (P>0.05). 3) With the ruminally degradable starch level increasing, the relative counts of *R. albus* and *R. amylophilus* in fermentation fluid after 24 h *in vitro* incubation were linearly increased (P<0.05), while the relative counts of *R. flavefacien*, *F. succinogenes*, *B. fibrisolvens*, *S. bovis* and *S. amylolytica* had no significant changes (P>0.05). It is concluded that increasing ruminally degradable starch level can improve ruminal fermentation in diet with low starch.

Key words: ruminally degradable starch; gas production; rumen fermentation; microflora

---

*Corresponding author, professor, E-mail: zhangyonggen@sina.com (责任编辑　菅景颖)